

## Dünnschichtchromatographische Bestimmung von 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure im Harn

Von H. STROBACH

*Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Düsseldorf (Direktor: Prof. Dr. med. K. Greeff)*

(Eingegangen am 17. August 1966)

In Anlehnung an das Verfahren von SCHMID wird eine Methode zur dünn-schichtchromatographischen Bestimmung der Vanillinmandelsäureausscheidung im Harn entwickelt. Dabei wird die Vanillinmandelsäure (VMS) mit Essigester extrahiert und der Extrakt dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel G aufgetrennt. Die VMS wird durch Besprühen der Chromatogramme mit diazotiertem p-Nitroanilin sichtbar gemacht, mit Pufferlösung eluiert und spektralphotometrisch bestimmt.

Die Normalwerte für die VMS-Ausscheidung lagen in unseren Versuchen zwischen 0,9 und 8,6 mg/24 Stdn. und betrugen im Mittel 4,1 mg. Bei 12 Patienten mit Phäochromocytom oder Neuroblastom wurden Werte von 10,8—142,3 mg VMS/24 Stdn. beobachtet.

A procedure, which depends upon SCHMID's method, was developed for the thin layer chromatographic determination of the urinary excretion of vanillylmandelic acid (VMA). The acid is extracted with ethyl acetate and the extract separated by thin layer chromatography on Kieselgel G. VMA is located by spraying with diazotised p-nitroaniline, eluted with buffer and determined spectrophotometrically.

In our experiments, the normal values for VMA excretion lay between 0.9 and 8.6 mg/24 hr. with an average of 4.1 mg. In 12 patients with phaeochromocytoma or neuroblastoma, values of 10.8—142.3 mg. VMA/24 hr. were observed.

Seit ARMSTRONG und Mitarbeiter (1, 2) 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure (Vanillinmandelsäure, „VMS“) als Metaboliten des Noradrenalinstoffwechsels im Harn nachweisen konnten, sind zahlreiche Untersuchungen über die Ausscheidung dieser Verbindung im Harn durchgeführt worden. VMS entsteht durch Methylierung des Adrenalins bzw. des Noradrenalins in C-3-Stellung (3—6) und oxydativer Desaminierung der entstandenen O-Methyl-derivate (7, 8). VMS ist also das gemeinsame Abbauprodukt des Adrenalins und Noradrenalins.

Adrenalin und Noradrenalin werden nach i. v. Infusion zu rund 4% der applizierten Dosis in unveränderter Form ausgeschieden. Rund 20—40% finden sich im Harn als O-Methyladrenalin bzw. O-Methylnoradrenalin wieder, der Rest vorwiegend als VMS (9, 10). Nach ARMSTRONG (2) scheiden Gesunde 1,5—3 mg VMS in 24 Stdn. aus. Von anderen Autoren durchgeführte Untersuchungen führten zu ähnlichen Ergebnissen (11—21).

Bei den bisher beschriebenen Bestimmungsverfahren wird die Vanillinmandelsäure nach Abtrennung durch Papierelektrophorese (14, 16, 17), Papierchromatographie (11, 12, 18) oder Dünnschichtchromatographie (19) kolorimetrisch bestimmt. Nach anderen Methoden wird VMS zu Vanillin umgesetzt, das mit Indol und Phosphorsäure einen kolorimetrisch bestimmbaren Farbkomplex liefert (13). Nach BRUNJES (22) wird VMS durch Perjodat oxydiert und UV-spektrophotometrisch bestimmt.

handelt. Die violettrote VMS-Bande wird noch feucht abgetragen und in Borat-Citratpuffer (pH 9,5) gebracht. Dabei werden sowohl der gebildete Farbstoff wie nicht umgesetzte Vanillinmandelsäure quantitativ eluiert. Nach Abzentrifugieren vom Kieselgel wird der Überstand mit verdünntem Sprühreagenz versetzt, das mit unverändert aus der Schicht eluierter Vanillinmandelsäure reagiert. Die Messung erfolgt bei 510 m $\mu$  gegen einen Reagenzienblindwert.

### Reagenzien

1. *VMS-Standard* (1 mg/ml): 100 mg VMS werden in 100 ml 0,01N HCl gelöst. Standardlösungen niedriger Konzentration stellt man durch entsprechendes Verdünnen mit 0,01N HCl her.
2. Natriumchlorid p. a.
3. Natriumsulfat p. a. wasserfrei
4. konz. Salzsäure p. a.
5. Essigester p. a.
6. 60-proz. Äthanol
7. 5-proz. Ammoniumsulfamat
8. 0,01N Salzsäure
9. *Borat-Citratpuffer pH 9,5*: 3,54 g Borsäure und 7,00 g Citronensäure werden in 900 ml Wasser gelöst. Sodann fügt man unter ständigem Rühren 13,70 g festes Natriumhydroxyd zu. Sobald sich alles gelöst hat, versetzt man langsam mit 2,23 ml 85-proz. Phosphorsäure und schließlich unter Rühren und Kontrolle des pH-Wertes mit dem pH-Meter tropfenweise mit soviel konz. Salzsäure, bis der pH-Wert genau 9,5 beträgt. Man füllt auf 1000 ml auf und kontrolliert den pH-Wert erneut.
10. *p-Nitroanilin-Stammlösung*: 100 mg p-Nitroanilin werden unter Rühren in 98 ml Wasser und 2 ml konz. Salzsäure gelöst.
11. *Natriumnitrit-Stammlösung*: 200 mg Natriumnitrit werden in 100 ml Wasser gelöst.
12. *Sprühreagenz*: Man vereinigt je nach Bedarf gleiche Volumina der eisgekühlten Lösungen 10 und 11 und hält die Mischung etwa 20 Min. im Kühlschrank. Anschließend versetzt man das Reagenz zur Zerstörung überschüssigen Nitrits mit  $\frac{1}{20}$  des Gesamtvolumens 5-proz. Ammoniumsulfamatlösung und schüttelt um, bis der größte Teil des sich entwickelnden Stickstoffs entwichen ist.
13. *Verdünntes Sprühreagenz*: Man verdünnt 2 ml der Lösung 12 mit 8 ml Wasser. Lösung 12 und 13 sind jedesmal vor Gebrauch frisch herzustellen.

### Aufstellung der Eichkurve

*Reiner Standard*: 0,1—1,0 ml VMS-Standard (entsprechend 1—23  $\mu$ g VMS) werden mit 0,01N HCl auf 1 ml aufgefüllt und mit 0,3 ml Reagenz 13 versetzt. Man gibt 6 ml Borat-Citratpuffer (pH 9,5) zu und schüttelt um. Nach 10 Min. wird die Extinktion bei

### Methodik

#### Prinzip

Vanillinmandelsäure wird aus dem angesäuerten, mit Kochsalz gesättigten Harn mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wird abgetrennt, eingedampft und der Rückstand mit 60-proz. Äthanol aufgenommen. Die Vanillinmandelsäure wird dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel G mit Essigester-Isopropanol-konz. Ammoniak (1:2:1) als Fließmittel abgetrennt. Das noch feuchte Chromatogramm wird mit diazotiertem p-Nitroanilin besprüht und kurze Zeit mit Ammoniak be-

510 m $\mu$  gegen einen Blindwert gemessen, der auf gleiche Weise wie die Proben jedoch ohne Zusatz von VMS angesetzt wurde. Im angegebenen Bereich verläuft die Extinktionskurve etwa linear. Der Quotient: Extinktion/ $\mu$ g VMS beträgt im Mittel 0,0417, die Fehlerbreite der Bestimmung  $\pm 2,9\%$ . Der gebildete Farbstoff ist stabil; die Extinktion ändert sich im Verlauf von 2 Stdn. nicht merklich.

**Chromatographie:** 1–23  $\mu$ g VMS werden in 8 cm breiten Streifen auf 0,25 mm dicke Schichten von Kieselgel G aufgetragen. Die Chromatogramme werden mit Essigester-Isopropanol-konz. Ammoniak (1:2:1) entwickelt und noch feucht mit Reagenz 12 besprüht. Man bringt die Platten 15–20 Sek. in eine mit etwa 20 ml konz. Ammoniak beschickte Kammer, trägt die angefärbten Zonen der noch feuchten Schicht ab und eluiert mit 6 ml Borat-Citratpuffer (pH 9,5). Man schüttelt 30 Sek. und zentrifugiert 15 Min. bei 4000 U./Min. Der Überstand wird in ein zweites Röhrchen mit 1 ml 0,01N HCl und 0,3 ml verdünntem Sprühreagenz dekantiert und umgeschüttelt. Nach 10 Min. wird bei 510 m $\mu$  gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Bei Konzentrationen von mehr als 1  $\mu$ g VMS verläuft die erhaltene Eichkurve linear. Der Quotient: Extinktion/ $\mu$ g VMS liegt mit 0,0380 etwa 10% niedriger als bei direkter Bestimmung der VMS ohne vorhergehende Chromatographie. Die Fehlerbreite der Methode beträgt  $\pm 4,2\%$  (Abb. 1).

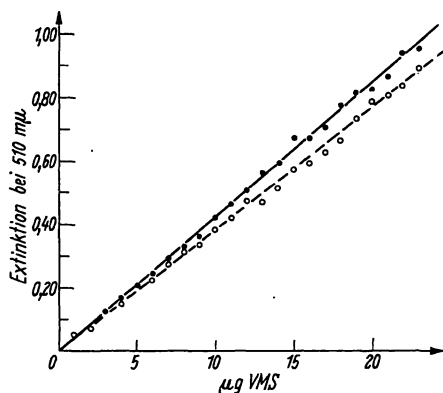


Abb. 1  
Die durchgezogene Linie stellt die mit reiner Vanillinmandelsäure erhaltene Eichkurve dar. Die gestrichelte Gerade wurde nach chromatographischer Trennung und Elution der Vanillinmandelsäure aus der Schicht gewonnen (ZEISS-Spektralphotometer PM Q II. Schichtdicke: 20 mm; Wellenlänge: 510 m $\mu$ )

### Aufarbeitung der Harnproben

20 ml des mit Schwefelsäure auf pH 3 angesäuerten 24 Stdn.-Sammelharnes werden mit 7 g Natriumchlorid versetzt und umgeschüttelt. Anschließend wird die Probe mit konz. HCl auf pH 1 angesäuert und dreimal je 2 Min. mit 40, 30 und 20 ml Essigester ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden vereinigt, unter gelegentlichem Umschütteln 20 Min. über 10 g Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das hinterbleibende Natriumsulfat wird mit weiteren 10 ml Essigester versetzt, umgeschüttelt und nach etwa 5 Min. erneut filtriert. Die vereinigten Filtrate werden auf zwei Erlenmeyerkolben von 100 ml Inhalt verteilt und in einem beheizbaren Vakuumexsikkator bei höchstens 40° auf etwa 5–10 ml eingedampft. Die hinterbleibende Lösung wird in einen 25 ml Erlenmeyerkolben überführt und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird nach völligem Abkühlen des Kölbchens mit 1 ml 60-proz. Äthanol aufgenommen.

### Dünnschichtchromatographische Trennung

Die dünnschichtchromatographische Trennung der erhaltenen Extrakte erfolgt auf Schichten von Kieselgel G (Schichtdicke 0,25 mm). Die Schicht wird durch senk-

rechte Striche in 2 Bahnen von 8 cm und zwei Bahnen von 1 cm Breite zerlegt. Auf eine 8 cm-Bahn trägt man je nach ausgeschiedener 24 Stdn.-Menge und erwarteter VMS-Konzentration 0,05–0,20 ml Extrakt in Streifenform auf. Etwa  $\frac{1}{8}$  der Menge wird — ebenfalls in Streifenform — auf eine der als Leitchromatogramm dienenden 1 cm-Bahnen aufgetragen. Auf das Leitchromatogramm trägt man noch zusätzlich 0,002 ml einer Lösung von 500  $\mu$ g VMS/ml 0,01N HCl (entsprechend 1  $\mu$ g VMS) als Vergleichssubstanz auf. Außer bei abnorm hoher Ausscheidung hebt sich die aufgetragene VMS im fertigen Chromatogramm stets als intensiv gefärbte Zone ab, so daß eine Verwechslung mit anderen, ähnlich gefärbten Substanzen im Chromatogramm nicht möglich ist. Auf die verbleibenden zwei Bahnen kann ein zweiter zu untersuchender Extrakt aufgetragen werden. Die Breite der aufgetragenen Streifen sollte 3–5 mm nicht überschreiten. Je breiter die Streifen an der Startlinie sind, desto breiter und unschärfer werden auch die Banden der einzelnen Substanzen im besprühten Chromatogramm.

Man entwickelt mit Essigester-Isopropanol-konz. Ammoniak (1:2:1) als Fließmittel ohne Kammerübersättigung, wobei in jeder Kammer nur ein Chromatogramm entwickelt werden darf. Die Laufstrecke beträgt 15 cm, die Trennzeit etwa 3–4 Stdn.

### Bestimmung der abgetrennten VMS

Man nimmt die entwickelte Platte aus der Kammer, streift die Schicht unterhalb der Startlinie ab und behandelt noch feucht mit unverdünntem Sprühreagenz. Es ist darauf zu achten, daß die Schicht gleichmäßig feucht bleibt, ohne daß jedoch Tropfen daran abfließen. Man besprüht dazu zweckmäßig in kurzen Intervallen und wartet bis das aufgesprühte Reagenz in die Schicht eingedrungen ist. Die Vanillinmandelsäure tritt als rot-violetter Streifen in Erscheinung und ist anhand der auf dem Leitchromatogramm aufgetragenen authentischen Substanz leicht zu lokalisieren. Nach dem Besprühen wird die Platte 15–20 Sek. in eine mit etwa 20 ml konz. Ammoniak beschickte Kammer gebracht. Der VMS-Streifen wird markiert, die Schicht noch feucht abgekratzt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 6 ml Borat-Citratpuffer (pH 9,5) gebracht. Man schüttelt etwa 30 Sek. und zentrifugiert 15 Min. bei 4000 U./Min. Der ganze Arbeitsgang vom Herausnehmen der Platte aus der Kammer bis zum Einbringen der abgekratzten Schicht in die Pufferlösung darf nicht mehr als 3–4 Min. beanspruchen. Antrocknen der Schicht vor oder nach dem Besprühen führt zu fehlerhaften (zu niedrigen) Werten.

Der nach dem Zentrifugieren erhaltene Überstand wird vorsichtig, ohne daß dabei der Niederschlag aufgewirbelt wird, in ein zweites Röhrchen mit 1 ml 0,01N HCl und 0,3 ml verdünntem Sprühreagenz umgefüllt. Man schüttelt kurz um und mißt nach 10 Min. gegen einen Reagenzienblindwert bei einer Wellenlänge von 510 m $\mu$ . Die in 24 Stdn. ausgeschiedene VMS wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{VMS} = \frac{H \times E}{20 \times e \times F \times 1000}$$

Dabei sind: VMS = mg VMS/24 Stdn.  
 H = 24 Stdn.-Harn in ml  
 E = gemessene Extinktion  
 e = aufgetragene Extraktmenge in ml  
 F = Extinktion/ $\mu$ g VMS = 0,038

### Reproduzierbarkeit und Ausbeute

8 Proben des gleichen Harnes wurden in der beschriebenen Weise getrennt aufgearbeitet und der VMS-Gehalt bestimmt. Die Standardabweichung betrug  $\pm 5,5\%$ . In einem weiteren Versuch wurden 8 von 10 Proben des gleichen Harnes 60–200  $\mu$ g VMS zugesetzt und alle 10 Proben in der beschriebenen Weise verarbeitet. Der in der Doppelbestimmung ermittelte Vanillinmandelsäuregehalt des ohne Zusätze verarbeiteten Harnes wurde

vom gefundenen Gesamtgehalt abgezogen. Dabei konnten durchschnittlich 99% der zugesetzten Vanillinmandelsäure wiedergefunden werden (83,5–114,8%).

### Ergebnisse

Bei der Bestimmung der Vanillinmandelsäureausscheidung im Harn von 71 gesunden männlichen und weiblichen Probanden im Alter von 3–64 Jahren fanden wir im Mittel eine VMS-Ausscheidung von 4,1 mg/24 Stdn. Die niedrigste Ausscheidung zeigte ein 3-jähriges Kind mit 0,9 mg, die höchste ein 28-jähriger Mann mit 8,6 mg VMS/24 Stdn. Bei mehr als 90% der untersuchten Proben lag die Ausscheidung jedoch zwischen 1,5–7,0 mg/24 Stdn. Bei 12 Patienten mit einem *Phaeochromocytom* oder *Neuroblastom* fanden wir VMS-Werte zwischen 10,8 und 142,3 (im Mittel 34,7) mg VMS/24 Stdn.

### Literatur

1. ARMSTRONG, M. D. und A. McMILLAN, *Federat. Proc.* 16, 146 (1957). — 2. ARMSTRONG, M. D., A. McMILLAN und K. N. F. SHAW, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 25, 422 (1957). — 3. AXELROD, J., *Science* (Washington) 126, 400 (1957). — 4. AXELROD, J., J. K. INSCOE, S. SENOH und B. WITKOP, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) 27, 210 (1958). — 5. AXELROD, J., S. SENOH und B. WITKOP, *J. biol. Chemistry* 233, 697 (1958). — 6. AXELROD, J. und R. TOMCHICK, *J. biol. Chemistry* 233, 702 (1958). — 7. AXELROD, J., *Science* (Washington) 127, 754 (1958). — 8. SOURKES, T. L., *Rev. canad. Biol.* 17, 328 (1958). — 9. GOODALL, McC., N. KIRSHNER und L. ROSEN, *J. Clin. Invest.* 38, 707 (1959). — 10. KIRSHNER, N., McC. GOODALL und L. ROSEN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 98, 627 (1958). — 11. KRAUPP, O., H. STORMANN, H. BERNISHEIMER und H. OBENAU, *Klin. Wschr.* 37, 77 (1959). — 12. ROBINSON, R., J. RATCLIFFE und J. SMITH, *J. Clin. Path.*, London 12, 541 (1959). — 13. SUNDERMAN, F. W. jr., P. D. CLEVELAND, N. C. LAW und F. W. SUNDERMAN, *Amer. J. Clin. Path.* 34, 293 (1960). — 14. v. STUDNITZ, W., *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 12, Suppl. 48 (1960). — 15. SANDLER, M. und C. R. J. RUTHVEN, *Biochem. J.* 80, 78 (1961). — 16. v. STUDNITZ, W. und A. HANSON, *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 11, 101 (1959). — 17. v. STUDNITZ, W., *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 11, 309 (1959). — 18. GITLOW, S. E., M. MENDLOWITZ, S. KHASIS, G. COHEN und J. SHA, *J. Clin. Invest.* 39, 221 (1960). — 19. SCHMID, E. und N. HENNING, *Klin. Wschr.* 41, 566 (1963). — 20. STROBACH, H., A. BEIERBACH und K. GREEFF, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* 251, 167 (1965). — 21. GREEFF, K. und H. STROBACH, *Verh. Dtsch. Ges. inn. Med.* 72, (1966). — 22. BRUNJES, S., *N. England J. Med.* 271, 120 (1964).

Dipl.-Chem. Hans Strobach,  
 4000 Düsseldorf, Moorenstr. 5

## Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamidgel

### II. Mitteilung: Die Trennung der Komponenten des Humanserums bei verschiedenen Trennstrecken

Von H. BIEL und O. ZWISLER

Aus der Behringwerke A. G., Marburg

(Eingegangen am 17. August 1966)

Der Einfluß der Wanderungsstrecke auf die Auftrennung von Humanserum und zweier Humanserumfraktionen bei Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamid wurde untersucht.

The influence of the distance of migration in electrophoresis in horizontal polyacrylamide gel was studied on the fractionation of human serum and of two human serum fractions.

In einer vorhergehenden Arbeit<sup>1)</sup> untersuchten wir bei vorgegebener Trennstrecke (Abstand Auftragstelle — Präalbumin etwa 25 cm), inwieweit durch Änderung der Pufferzusammensetzung und -ionenstärke, der Gelkonzentration und dem Grad der Quervernetzung die Trennung der Komponenten des normalen Humanserums verbessert werden konnte. In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, welchen Einfluß die Wanderungsstrecke auf die Trennung der Serumproteine besitzt.

<sup>1)</sup> ZWISLER, O. u. H. BIEL diese Z. 4, 58 (1966).

### Methodik

#### Testsubstanzen zur Elektrophorese

Normales Humanserum Hp 2—1, Gc 1—1 = „NMS“  
 Gesamt- $\alpha$ -Fraktion eines normalen Humanserums Hp 1—1, gewonnen durch Elektrophorese in Polyvinylchlorid = „PVCE  $\alpha$ -Fr“  
 $\alpha_2$ -Fraktion eines normalen Humanserums Hp- 2—2, gewonnen durch zweimalige Elektrophorese in Polyvinylchlorid = „PVCE  $\alpha_2$ -Fr“

#### Elektrophorese in PAA-Gel

Cyanogum 41 wurde 5,5-proz. (g/Vol.) in Gelpuffer (0,0550M Tris — 0,00646M Zitronensäure — 0,00268M NaOH — 0,00813M